

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



1 / 1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-252952
(43)Date of publication of application : 05.10.1993

(51)Int.Cl.

C12N 11/12
C12N 11/04
G01N 27/327
G01N 27/416
G01N 27/49
G01N 33/18

(21)Application number : 04-053804
(22)Date of filing : 12.03.1992

(71)Applicant : NAKANO VINEGAR CO LTD
(72)Inventor : SATO TAKESHI
KATOU NAHO
AKANO HIROFUMI
KAWAMURA KICHIYA

(54) FIXATION OF MICROORGANISM, FIXED MICROORGANISMIC MEMBRANE, MEASUREMENT OF BOD OR SULFINIC ACID AND MEASURING EQUIPMENT THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a fixed microorganismic membrane having sufficient response, sufficient sensitivity, stability and durability, and useful as a biological device, etc., of a sulfuric acid detector by fixing a microorganism to a hydrophilic porous membrane having a specified average pore diameter using a gelling agent.
CONSTITUTION: Microorganisms are fixed to a hydrophilic porous membrane (e.g. membrane made of acetylcellulose for membrane filtration) having 0.65 to 3μm average pore diameter by using a gelling agent (Alginic acid, agar-agar, etc., are preferably used). Specifically, washed microorganismic cells are mixed with a gelling agent solution and the resultant microorganism-containing gelling agent solution is dropped on the porous membrane. The porous membrane is then sucked from its back surface or pressurized from the upper side so as to infiltrate the above-mentioned solution into the holes of the porous membrane. Thereby, the microorganisms are fixed together with the gelling agent.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 17.02.1998
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number] 3016529
[Date of registration] 24.12.1999
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-252952

(43)公開日 平成5年(1993)10月5日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 11/12				
11/04				
G 0 1 N 27/327				
	7235-2 J	G 0 1 N 27/ 30	3 5 5	
	7235-2 J	27/ 46	3 0 1 N	
審査請求 未請求 請求項の数4(全 7 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-53804

(22)出願日 平成4年(1992)3月12日

(71)出願人 390022644

株式会社中笠酢店

愛知県半田市の中村町2丁目6番地

(72)発明者 佐藤 猛

岐阜県土岐市泉町久尻561-17

(72)発明者 加藤 奈穂

愛知県知多郡阿久比町大字福住申田26-15

(72)発明者 赤野 裕文

愛知県半田市有脇町2-46-28

(72)発明者 川村 吉也

愛知県江南市古知野町古渡132

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 微生物の固定化法、微生物の固定化膜、並びにBOD又は
法及び測定装置

亜硫酸の測定方

(57)【要約】

【構成】 平均細孔径が $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下である親水性の多孔質膜の中に微生物をゲル化材で固定化することを特徴とする微生物固定化方法。当該方法でえられた微生物固定化膜、当該微生物固定化膜をBOD測定又は亜硫酸測定用の生体素子として使用することを特徴とするBOD測定又は亜硫酸測定方法及び生体素子が前記微生物固定化膜であるBOD又は亜硫酸測定装置。

【効果】 本発明の方法により得られる微生物固定化膜は、これをBOD又は亜硫酸の測定に使用したとき感度、応答性、安定性、耐久性において優れた効果を示した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 平均細孔径が $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下である親水性の多孔質膜の中に微生物をゲル化材で固定化することを特徴とする微生物固定化方法。

【請求項2】 平均細孔径が $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下である親水性の多孔質膜の中に微生物をゲル化材で固定化した微生物固定化膜。

【請求項3】 請求項第2項記載の微生物固定化膜をBOD測定又は亜硫酸測定用の生体素子として使用することを特徴とするBOD測定又は亜硫酸測定方法。

【請求項4】 生体素子が請求項第2項記載の微生物固定化膜であるBOD又は亜硫酸測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は微生物の固定化法、微生物の固定化膜、並びにBOD又は亜硫酸の測定方法及び測定装置に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、微生物固定化膜の製造法に関しては、種々の方法が開発されており、例えば(1)微生物をコラーゲンやポリアクリルアミドなどの高分子固定化用担体で固定化、製膜する方法(特公昭58-30537号公報)、また(2)多孔質板を微生物の生息している液中に浸漬するかまたは、微生物の生息している液を強制的に多孔質板に流通させて、多孔質板の微細孔内に微生物を生息させる方法(特公昭57-15696号公報)などが知られている。

【0003】しかし、上記(1)においては厚さの均一な薄膜を製造する操作が難しく薄膜の品質を常に一定に保つことが困難であるという問題点があった。また、(2)の方法においては、多孔質板中の微細孔内に生息する微生物が測定中に脱離するなどして菌数が安定せず応答と感度が不安定になるという問題点を有していた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者らは充分な応答性、感度、安定性、耐久性を兼ね備えた微生物固定化膜の開発を目的として鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、平均細孔径が $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下である親水性の多孔質膜の中に微生物をゲル化材で固定化することを特徴とする微生物固定化方法、平均細孔径が $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下である親水性の多孔質膜の中に微生物をゲル化材で固定化した微生物固定化膜、該微生物固定化膜をBOD測定又は亜硫酸測定用の生体素子として使用することを特徴とするBOD測定又は亜硫酸測定方法、及び生体素子が前記微生物固定化膜であるBOD又は亜硫酸測定装置である。

【0006】以下に本発明を詳細に説明する。本発明に

使用することのできる固定化用支持体、即ち多孔質膜としては酸素、亜硫酸、各種有機化合物、各種無機化合物などを溶液状またはガス状で自由に通過せしめる親水性の多孔質膜であればいずれでも良く、例えばメンブラン濾過膜や非対称限外濾過膜等を使用することができる。材質はニトロセルロース、アセチルセルロースなどのセルロースエステル化合物や親水化ポリ沸化ビニリデン、ポリエーテルスルホン等が使用できる。尚、本発明で使用する親水性の多孔質膜は、生体素子として用いる際、応答性を向上させるために使用する電極表面に該多孔質膜を完全に密着させることが必要であり、従って柔軟性があり、該電極表面の形状に合わせることで素材よりなる多孔質膜を使用することが必要である。

【0007】また本発明の多孔質膜は、目的とする微生物をその多孔質構造の中に保持することが必要であり、その多孔質構造における細孔は平均細孔径が $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下であることが望ましい。尚、非対称限外濾過膜を使用する時には、表面側即ち、孔径が大きい側の平均細孔径が $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下であれば差し支えない。また、使用する多孔質膜の膜厚は用途に応じて適宜選択すれば良く、一般的には $50\mu\text{m}$ 以上 $200\mu\text{m}$ 以下が操作性と強度、柔軟性の面から使用の好適範囲である。

【0008】微生物を多孔質膜に保持するための固定化用担体、即ちゲル化材としては、親水性のゲルを形成するものであればいずれも使用することができるが、例えば、アルギン酸、寒天、ジェランガム、キサンタンガム、ゼラチン、カラギーナン、メチルセルロース、ペクチン、プルランなどが好適である。次に微生物の固定化方法について説明する。

【0009】目的の微生物は生育に適切な培地で培養した後、集菌、洗浄を行い、洗浄菌体として使用する。得られた微生物をアルギン酸などのゲル化材の溶液に適宜混合して微生物混合ゲル化材溶液とし、該溶液をアセチルセルロースメンブランフィルターなどの多孔質膜上に滴下し、多孔質膜の下部から吸引または、上部から加圧して多孔質膜の孔の中に浸潤させ、ゲル化材ごと微生物を固定する。多孔質膜表面に残存する微生物混合ゲル化材溶液が浸潤して多孔質膜中に全て移行するまで吸引もしくは加圧して、微生物混合ゲル化材が多孔質膜中に保持されるようにする。この時の吸引や加圧の強さの程度は、多孔質膜が破損しない程度であれば良い。

【0010】即ち、菌体表面をゲル化材で被覆された微生物を多孔質膜の穴の中に埋め込み、多孔質膜素材と微生物の間にゲル化材を存在せしめ、その後、使用するゲル化材に応じた所定の方法によりゲル化材を固化させることにより微生物を多孔質膜中に固定し、多孔質膜の孔から微生物が脱離することのない優れた微生物固定化膜を製造する。ゲル化材の固化にはカルシウム等の無機塩類や、重合材等の固化材でゲル化させたり、冷却して固

化させたりする方法等を使用することができる。

【0011】本発明によれば、使用するゲル化材は微量で良く、ゲル化させる処理時間も短時間で、処理温度も室温程度で充分であるため、微生物を温和な条件で処理でき、従って、使用する微生物に損傷を与えないので、微生物活性が高く維持できる。また酸素、亜硫酸、各種有機化合物、各種無機化合物などの通過性は高く高感度であり、且つ、本発明の微生物固定化膜の一部が破損しても内部からの微生物の漏出は非常にわずかであり、該膜の寿命も今までになく長いという特徴を有する微生物固定化膜がはじめて得られた。

【0012】次に、本発明の微生物固定化法を使用して、BOD（生物化学的酸素要求量）、並びに、亜硫酸を測定する方法について述べる。本発明者らはこれまで、BODの測定についてはクレブシエラ属（*Klebsiella*属）に属する微生物を用いる測定方法（特願平3-30769号）、亜硫酸の測定についてはチオバチルス属（*Thiobacillus*属）に属する微生物を用いる測定方法（特願平3-256814号）を完成し特許出願している。

【0013】上記発明においてBODの測定はクレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜と酸素電極を組み合わせて測定する方法であり、亜硫酸の測定はチオバチルス属に属する微生物を固定化した微生物膜と酸素電極を組み合わせて測定する方法であるが、いずれの方法においてもそれぞれ使用する微生物を本発明による微生物固定化方法にて製造した微生物固定化膜とし、酸素電極と組み合わせて行うことで応答性に優れ、高感度な生体素子として使用できる。

【0014】

【発明の効果】本発明の方法により得られる微生物固定化膜は、これをBOD又は亜硫酸の測定に使用したとき感度、応答性、安定性、耐久性において優れた効果が示され、当該微生物固定化膜を使用して優れたBOD又は亜硫酸の測定法及び測定装置が提供された。

【0015】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

実施例1 クレブシエラ オキシトカ12092 (*Klebsiella oxytoca*12092) の固定化

クレブシエラ オキシトカ12092 (FERM BP-3616)をポリペプトン1%、酵母エキス0.1%塩化ナトリウム0.5%を含む液体培地 100mlの入った 500ml容三角フラスコに接種し、30℃にて24時間好気的条件下で振盪培養を行った。培養終了後培養液を6000rpmで20分間遠心分離して菌体を集めた。得られた菌体に少量の滅菌蒸留水を加えて懸濁し、再度遠心分離して洗浄を行った。この洗浄を3回繰り返し洗浄菌体として150mg（乾重）を得た。

【0016】この洗浄菌体0.4mg（乾重）相当を、滅菌した3%アルギン酸ナトリウム水溶液50μlに混合し、

平均細孔径0.8 μmのアセチルセルロース膜（ミリポア社製メンブランフィルタータイプHA）上に滴下し、この微生物混合溶液が該膜中に全て保持されるまで膜の下部より吸引し、浸潤させて該膜中に固定した。該膜を通過した余剰のアルギン酸水溶液はそのまま膜の下部より滴下させて除けば良い。次に、この微生物を保持した該膜を5%塩化カルシウム水溶液50ml中に室温で10分間浸漬してアルギン酸を固化させ微生物固定化膜を得た。

実施例2 BODの測定

実施例1で得られた本発明微生物固定化膜を用いてBOD標準液（JIS-K0102）の測定を行った。図1に示すように酸素電極3とキャップ1の間に微生物固定化膜2を装着して微生物電極を作成し、図2に示す装置で測定した。装置の概略は、次の通りである。試料ビン4から採取されたBOD標準液は、電磁弁5を通りポンプ6を経て、フローセル7に導かれる。フローセル7中は、モーター10により攪拌子9で攪拌される。酸素電極3の電極面にキャップ1で外嵌された微生物固定化膜2から構成される微生物電極8で検知された値はアンプ部13で増幅され、記録計14で記録される。測定を終了した試料は廃液槽11に入る。測定終了後、電磁弁5を切り替えて洗浄液槽12より洗浄液を通じて洗浄を行う。測定温度は30℃、試料流通時間（測定時間）は3分、試料量は10mlである。尚、測定に供する試料及び洗浄液に必要な応じて空気を通気するかまたは、フローセル7に至る経路の途中で通気しても良い。本装置を使用して各種濃度のBOD標準液を測定した結果、図3に示すようにBODの濃度とそれに対応する酸素電極の電圧変化量の間にはきわめて良い直線関係が得られた。また、鹿児島県の食品工場から採取した廃液について同様の条件でBODを測定した値を公定法である5日間法による測定値と比較したところ、本発明微生物固定化膜を使用した測定値は42ppm、5日間法では45ppmであり良く一致した結果が得られた。この結果より、本発明は実際の試料についても充分利用可能であることがわかった。

実施例3 多孔質膜の平均細孔径の比較

平均細孔径の異なる市販の多孔質膜に、実施例1で得た微生物菌体を同様の方法で固定化し、実施例2で使用した装置の微生物電極に装着して同様の条件でBOD標準液を測定した。各種濃度のBOD標準液を測定した結果を図4、濃度66ppmのBOD標準液を繰り返し測定した結果を図5に示す。この結果、平均細孔径0.45 μmの多孔質膜で製造した微生物固定化膜では応答が低く、平均細孔径5 μmの多孔質膜で製造した微生物固定化膜では繰り返し測定すると感度が低下して測定できなくなった。平均細孔径0.65 μm以上の多孔質膜を使用して製造した微生物固定化膜ではBOD濃度とそれに対応する酸素電極の電圧変化量の間にはきわめて良い直線関係が得られ、繰り返し測定では平均細孔径3 μm以下の多孔質膜を使用して製造した微生物固定化膜を使用したときに

安定した応答が得られた。これらの結果より、平均細孔径 $0.65\mu\text{m}$ 以上 $3\mu\text{m}$ 以下の多孔質膜を使用して製造した微生物固定化膜を用いたときに高感度で安定性に優れた測定ができることが明らかである。

実施例4 多孔質膜の比較

多孔質膜の膜厚が $150\mu\text{m}$ で平均細孔径の異なるアセチルセルロース製の多孔質膜に、実施例1で得た微生物菌体をゲル化材を使用しないで該膜の上部に滴下し浸潤させ、該膜下部より吸引して該膜の孔の中にトラップして微生物固定化膜を製造した。

【0017】次に実施例1と同様の方法で本発明微生物*

平均細孔径 (μm)	0.45	0.65	0.8	3.0	5.0	本発明
BOD標準液 (66ppm) に対する応答 (ΔmV)	20	60	40	0	0	600

【0019】その結果を表2に示したが、平均細孔径 $0.8\mu\text{m}$ 以下の多孔質膜を使用した場合は測定ができなかった。これは、測定に際し、試料を流通させる前に洗浄水を反応槽に流通し、微生物電極の示す初期の酸素濃度レベル、いわゆるベースラインを求める段階で、すでに酸素電極の示す表2の電圧値が20から40mVであり、ほと

んど無酸素の状態を示し、その状態から微生物が各種有機物を資化する際における酸素濃度変化を測定することが不可能なためである。

【0020】

【表2】

平均細孔径 (μm)	0.45	0.65	0.8	3.0	5.0	本発明
試料流通時間						
3分 (ΔmV)	—	—	—	0	0	600
30分 (ΔmV)	—	—	—	80	150	測定せず
ベースライン電圧値 (mV)	20	30	40	200	300	1000

—：測定不可能

【0021】この状況は、洗浄水および/または試料中の酸素が該微生物固定化膜中を自由に通過できないことを示している。また平均細孔径 $3\mu\text{m}$ 以上の微生物固定化膜では、ベースラインを示す表2の電圧値は200から300mVであり、比較的高い値を示した。しかし、試料流通時間3分の条件では応答が見られず、試料流通時間30分でわずかに応答が得られたに過ぎなかった。これらに比べ本発明微生物固定化膜はベースラインを示す電圧値は1000mVと高く、かつ試料流通時間も3分で応答が得られ、迅速な測定ができることがわかる。従って、本発明による微生物固定化膜は応答に優れるばかりでなく迅速

な測定もできることが明らかである

実施例5 固定化法の比較

実施例1で得られた微生物を同様の方法で固定化して得られた本発明微生物固定化膜と、実施例1で得られた微生物の同一菌体量を、10重量%アクリルアミド溶液に混合し、常法によりゲル化し膜厚 $200\mu\text{m}$ のポリアクリルアミド固定化微生物膜を製造した。これらの微生物固定化膜を実施例2の装置に装着しBOD標準液の測定を行った。その結果、図6に示すように本発明微生物固定化膜(A)は試料流通時間3分で濃度66ppmのBOD溶液に対して、600mVの応答が得られたが、ポリアクリルア

ミド固定化微生物膜(B)では応答が得られず、試料流通時間を30分とした時に濃度66ppmのBOD溶液に対して、150mVの応答が得られた。この様に、本発明微生物固定化膜による測定では応答性と迅速性が明らかに優れていることがわかる。また、ポリアクリルアミド固定化微生物膜は酸素電極に装着する際に強く装着すると破損することがあり、注意を要した。

実施例6 亜硫酸の測定

チオパチルス チオオキシダンス20294 (Thiobacillus thiooxidans 20294) (FERM BP-3467) を下記の組成を含む滅菌した培地50mlの入った200ml容三角フラスコに接種し、30℃にて4日間振とう培養を行った。この培養液2mlを同じ培地100mlを入れた300ml容エーレンマイヤーフラスコに無菌的に接種し、30℃にて10日間振とう培養を行った。培養終了後、培養液を東洋濾紙製 No.5c 濾紙を用いて濾過し、イオウ粉末を除去した。得られた濾液中の菌体量は0.4g 乾燥菌体/L 培養液であった。

培地組成

イオウ粉末	1.0%
K ₂ HPO ₄	0.05%
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.001%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3%
KCl	0.01%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05%

蒸留水に以上成分を混合する

pH 6.5

得られた菌体を11000rpmで15分間遠心分離し、集菌した。集めた菌体を少量の冷蒸留水で懸濁し再度、遠心分離を行い菌体を洗浄する操作を2回繰り返して洗浄菌体を得た。洗浄菌体0.4mg(乾重)を3%アルギン酸ナトリウム溶液50μlに混合し、実施例1と同様に多孔質膜(平均細孔径0.8μm)に固定した。

【0022】この微生物固定化膜を図7に示した亜硫酸測定電極に装着して図2のフローセル装置で測定した。図7は酸素電極15とガス透過性膜16、緩衝液(0.1Mクエン酸ナトリウム-水酸化ナトリウム pH 5) 17及び微生物固定化膜18よりなる。試料としては各種濃度の亜硫酸水素ナトリウム溶液(5mM硫酸酸性溶液 pH 2)を用いた。図8に示すように亜硫酸濃度とそれに応答する酸素電極の電圧変化量の間にはきわめて良い直線関係が得られた。また、本発明者等が既に完成し、特許出願している方法(特願平3-256814)に従って製造した微生物固定化膜を使用して亜硫酸を測定した結果と、本発明の微生物固定化膜を使用して亜硫酸を測定した結果とを比較した所、本発明による微生物固定化膜は同じ濃度の亜硫酸に対する電圧変化量が大きく、より高感度な測定ができた。

実施例7 限外濾過膜を使用した固定化

非対称限外濾過膜(フジフィルター社製フィルترون限外濾過膜オメガメンブレン)を使用し、実施例1で得られた微生物菌体を同様の方法で固定化し、固定化微生物膜を得た。これを実施例2で使用した装置に装着し、BOD標準液を測定した。図9に示すようにBOD標準液の濃度とそれに応答する酸素電極の電圧変化量の間には極めて良好な直線関係が得られ、かつ感度も高いことがわかった。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の微生物電極を示す図である。

【図2】BODの測定装置を示す図である。

【図3】図2に示す装置を用いて各種濃度のBOD標準液を測定した結果を示す図である。

【図4】平均細孔径の異なる多孔質膜を用い、図2に示す装置を用いて各種濃度のBOD標準液を測定した結果を示す図である。

【図5】平均細孔径の異なる多孔質膜を用い、図2に示す装置を用いて各種濃度のBOD標準液を測定した結果を示す図である。

【図6】本発明の微生物固定化膜とポリアクリルアミドをそれぞれ用いて応答感度を比較した図を示す。

【図7】微生物固定化膜を装着した亜硫酸測定電極を示す図である。

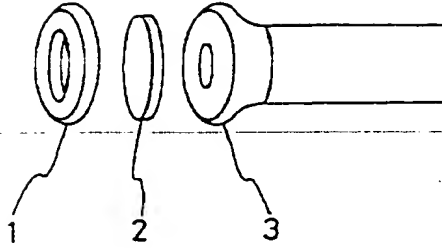
【図8】各種濃度の亜硫酸水素ナトリウム溶液を測定した結果を示す図である。

【図9】非対称限外濾過膜を使用した微生物固定化膜で各種濃度のBOD標準液を測定した結果を示す図である。

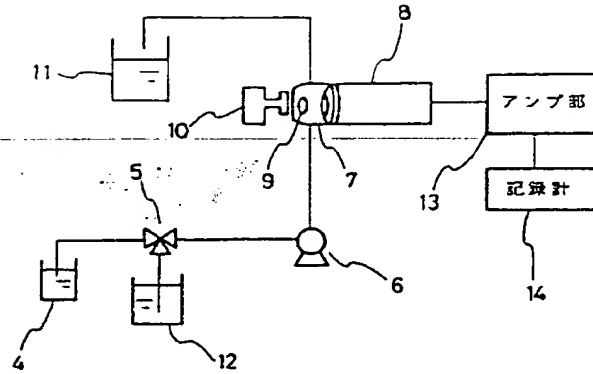
【符号の説明】

- 1 キャップ
- 2,18 微生物固定化膜
- 3,15 酸素電極
- 4 試料ビン
- 5 電磁弁
- 6 ポンプ
- 7 フローセル
- 8 微生物電極
- 9 攪拌子
- 10 モーター
- 11 廃液槽
- 12 洗浄液槽
- 13 アンブ部
- 14 記録計
- 16 ガス透過性膜
- 17 緩衝液

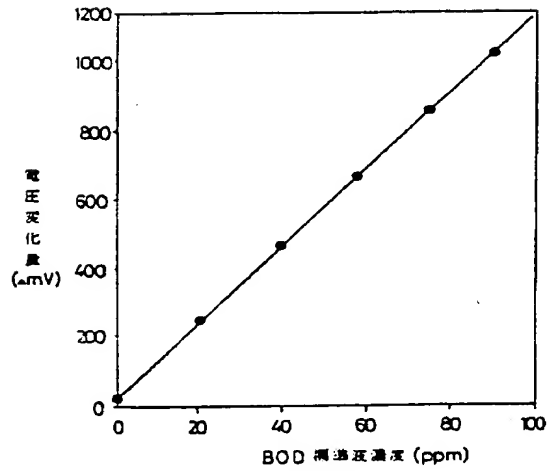
【図1】



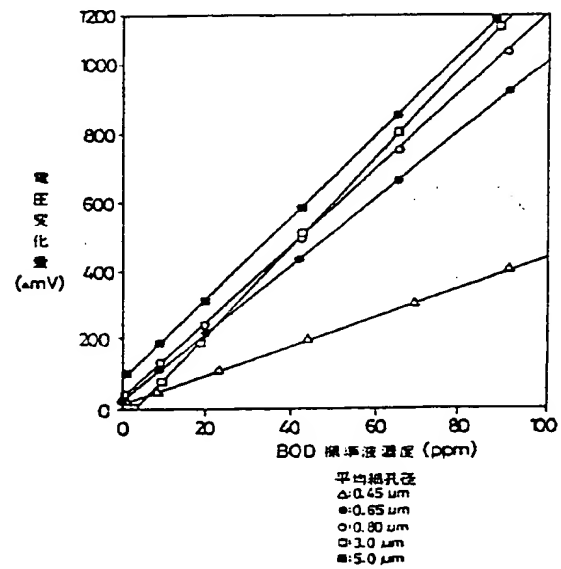
【図2】



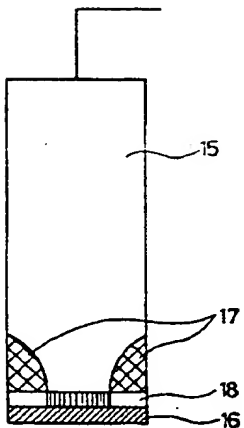
【図3】



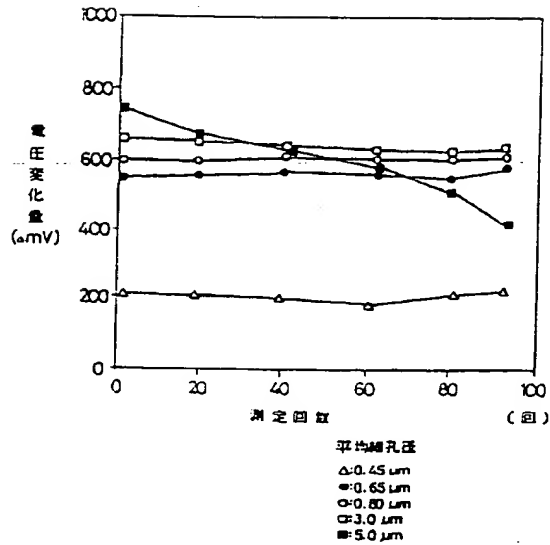
【図4】



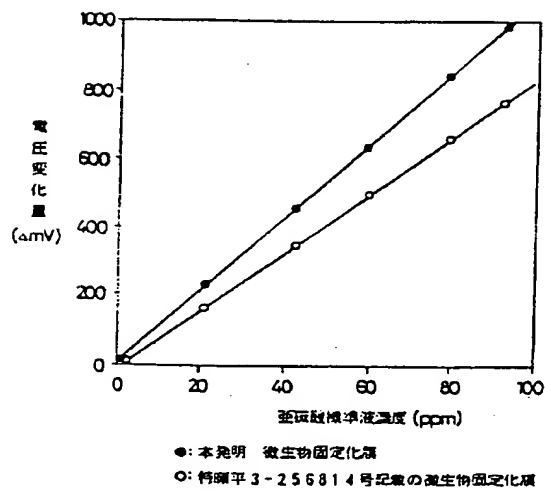
【図7】



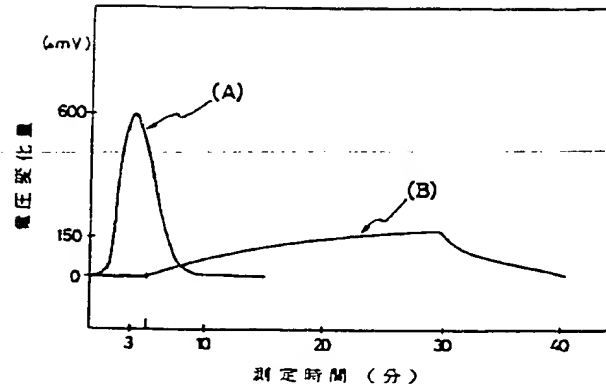
【図5】



【図8】



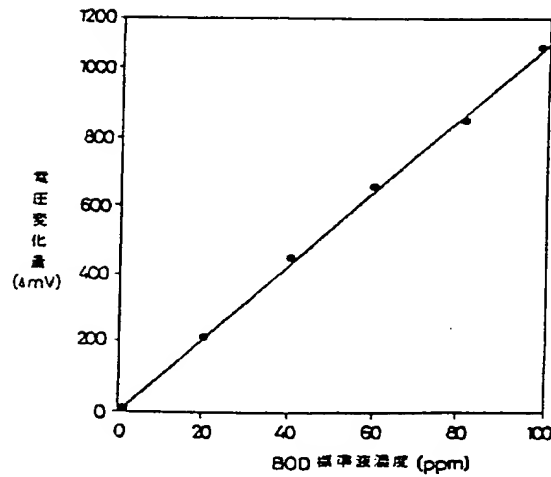
【図6】



(A) 本発明微生物固定化膜 (試料流通時間 3 分)

(B) ポリアクリルアミド固定化微生物膜 (試料流通時間 30 分)

【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.¹

G 0 1 N 27/416

27/49

33/18

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

1 0 5

9015-2J

7235-2J

G 0 1 N 27/46

3 0 6